

Nutrient-mucosal interactions in the human small intestine : the role of iron and lactoferrin

Citation for published version (APA):

Troost, F. J. (2003). *Nutrient-mucosal interactions in the human small intestine : the role of iron and lactoferrin*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20031210ft>

Document status and date:

Published: 01/01/2003

DOI:

[10.26481/dis.20031210ft](https://doi.org/10.26481/dis.20031210ft)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

Summary

The small intestinal mucosa forms a functional, tightly controlled barrier against intrusion of a wide variety of pathogenic components. Its integrity may be compromised by factors such as dietary pathogens and toxic food ingredients. In this thesis research is focussed on two food ingredients with positive but potentially also negative health aspects; iron and lactoferrin. Iron is an important micronutrient, due to its participation in many biochemical processes, however, free iron ions are known to catalyze the formation of highly reactive hydroxyl radicals. These radicals are extremely reactive, and may cause damage to all biological molecules in the body. Hence, iron ingestion may lead to undesirable side effects in the gastrointestinal tract and also, iron may compete for absorption with other micronutrients, especially divalent cations such as zinc and copper. The presence of high amounts of dietary iron may, therefore, impair the bioavailability of zinc and copper. In this thesis we investigated the deleterious effects of iron administration on the integrity and biochemistry of the small intestinal mucosa, and on the bioavailability of zinc and copper. The milk protein lactoferrin is a food ingredient with potential positive effects on the intestinal mucosa due to its biological activity, among others the antioxidant and iron binding capacity. We investigated effects of lactoferrin in the small intestine as a second food ingredient.

Chapter 2 describes a study of the effects of iron supplementation on the integrity of the small intestinal mucosa. In this placebo-controlled study, we showed that small intestinal permeability, a well-accepted indicator of the integrity of the small intestinal mucosa and a parameter of epithelial damage, was not affected by oral iron supplementation at daily dosages of 100 mg iron for 28 days. These findings suggested that, in contrast with previous data from *in vitro* and animal studies, iron did not induce oxidative stress in the intestine. To investigate iron-mediated biochemical processes in the small intestine *in vivo*, we developed an intestinal perfusion technique. **Chapter 3** describes the results of the first study applying this novel technique. We administered iron into the proximal small intestine, and sampled small intestinal fluid. We showed that iron administration induced lipid peroxidation, a parameter of oxidative damage, in the lumen of the small intestine. This was accompanied by a momentary rise in total antioxidant capacity of the samples, suggesting that oxidative stress triggered the release of a powerful but yet unidentified antioxidant in the small intestine. In this study, we were unable to investigate the effects of iron administration on the small intestinal mucosa. Therefore, in the study described in **chapter 4**, the intestinal perfusion technique in humans was combined with gastroduodenoscopy to obtain tissue samples from the small intestinal mucosa. The effects of different dosages of iron on oxidative stress and antioxidant capacity in small intestinal secretions and on gene expression profiles in small intestinal mucosa were investigated. We showed that iron administration in the small intestine caused oxidative damage and the release of antioxidants in a dose-dependent manner. Also, the iron intervention resulted in changes in the expression of eighty-nine genes. Functional mapping of genome-wide microarray experiments, carried out to investigate changes in gene expression profiles, identified six biological processes that were significantly mediated by the iron intervention. Although it is clear that several of these processes were associated with cell signalling

pathways, the biological implication of these results will have to be elucidated in future studies, specifically aiming to investigate these processes.

A study of the interaction between iron, zinc and copper was described in **chapter 5**. The investigation was designed to quantify zinc and copper absorption in the small intestine in the presence of different amounts of iron. We showed that a single dosage of iron significantly inhibited zinc absorption. The rate of inhibition of zinc absorption was not dependent on the dosage of iron. Copper absorption was not affected by the presence of iron.

The milk protein lactoferrin is suggested to exert many different biological activities in the intestine, in part due to its strong iron-binding capacity. Antioxidative, antiviral, anti-inflammatory and bactericidal properties were previously attributed to the molecule. Prior to studying its possible application as a functional food ingredient to decrease or prevent gastrointestinal disorders, it is important to obtain detailed information about its gastrointestinal survival rate. Gastric digestion of bovine lactoferrin was investigated in the study described in **chapter 6**. We showed that more than 60 % of all lactoferrin administered to the stomach survived gastric transit. It was previously suggested that iron-saturated lactoferrin (hololactoferrin) was less susceptible to gastrointestinal degradation than the iron-unsaturated form (apolactoferrin). However, this study showed that gastric digestion of holo- and apolactoferrin *in vivo* did not statistically differ. The metabolic fate of lactoferrin after oral administration, and after transit through the stomach and the small intestine, was investigated in the study described in **chapter 7**. We demonstrated in this study applying the ileostomy model that orally administered recombinant human lactoferrin is completely digested before it is emptied from the small intestine. We observed small but relatively constant amounts of intact human lactoferrin appearing in the ileal effluent, and suggest that these trace amounts of lactoferrin originated, most likely, from an endogenous source, such as the granules of infiltrating neutrophils in the small intestine.

We investigated the capacity of lactoferrin to prevent or inhibit mucosal damage in the stomach and in the small intestine *in vivo* in the study described in **chapter 8**. The non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin was administered to healthy volunteers to provoke damage to the intestinal epithelium. This caused standardized, well-investigated and reproducible gastrointestinal damage, which was quantified by measuring the permeability of the small intestine using the lactulose/rhamnose gut permeability test. Oral lactoferrin supplementation reduced the indomethacin-induced damage to the mucosa of the small intestine. This is the first study to show a functional, beneficial effect of lactoferrin supplementation in humans, and justifies the design of further studies to investigate the application of lactoferrin supplements in patients suffering from gastrointestinal disorders, as well as healthy people, in order to prevent gastrointestinal discomfort.

SAMENVATTING

Samenvatting

De binnenwand van de dunne darm, de darmmucosa, vormt een functionele verdediging tegen het binnendringen van ziekteverwekkers. De integriteit van de darmmucosa kan verminderen onder invloed van verschillende factoren, bijvoorbeeld ten gevolge van pathogene bacteriën of toxische componenten die via de voeding de darm binnen komen. In dit proefschrift worden twee voedingscomponenten bestudeerd. Enerzijds is het onderzoek gericht op het melkeiwit lactoferrine als voorbeeld van een voedingsingredient met mogelijke positieve eigenschappen ten aanzien van de integriteit van de darm. Anderzijds is speciale aandacht besteed aan het micronutrient ijzer, dat een belangrijke functie heeft in vele biochemische processen. Het is echter bekend dat de aanwezigheid van ijzer kan leiden tot een snelle vorming van schadelijke hydroxyl radicalen. Deze radicalen zijn zeer reactief, en kunnen schade berokkenen aan alle biologische molecule in het lichaam. Dien tengevolge kan de inname van ijzer leiden tot het optreden van ongewenste bijwerkingen in het spijsverteringskanaal. Bovendien kan ijzer de opname van andere micronutrienten, zoals zink en koper, remmen omdat deze metalen voor een deel via een identiek mechanisme worden opgenomen vanuit de darm. Hierdoor ontstaat een competitie voor opname. De aanwezigheid van grote hoeveelheden ijzer in de voeding kan dus wellicht de biologische beschikbaarheid van zink en koper remmen.

In dit proefschrift hebben wij enerzijds de schadelijke effecten van ijzertoeiening op de integriteit van de darmmucosa en op biochemische processen in de dunne darm bestudeerd, alsmede de invloed van de aanwezigheid van ijzer op de opname van zink en koper. Anderzijds is onderzoek verricht naar het afbraak in en de effecten van lactoferrine in het spijsverteringskanaal.

In het onderzoek dat in **hoofdstuk 2** beschreven staat is het effect van ijzersuppletie op de integriteit van de dunne darm onderzocht. We hebben aangetoond dat de doorlaatbaarheid, ofwel de permeabiliteit, van de dunne darm, hetgeen een maat is voor integriteit van de darmwand en gebruikt kan worden als een parameter van darmschade, niet beïnvloed wordt door ijzersuppletie. Deze bevinding duidt er op dat ijzer geen schade aan de darmwand veroorzaakt. Dit is in tegenspraak met de gegevens die uit eerder gepubliceerd reageerbuis- en proefdieronderzoek beschikbaar zijn. We hebben een darmperfusietechniek ontwikkeld om het mogelijk te maken de invloed van ijzer op biochemische processen in de darmholte te bestuderen. Hierbij wordt bij gezonde mensen een deel van de dunne darm doorgespoeld met een vloeistof en kunnen darmsapmonsters worden afgenomen. In **hoofdstuk 3** wordt het eerste onderzoek beschreven waarin gebruik is gemaakt van deze nieuwe techniek. Hierbij hebben we het eerste deel van de dunne darm doorspoeld met een ijzerhoudende oplossing. Tijdens deze perfusie zijn darmsapmonsters afgenomen. De resultaten van dit onderzoek laten zien dat toediening van ijzer in de darm leidt tot een snelle vorming van vetzuurperoxides. Dit is een maat voor oxidatieve schade. We hebben bovendien aangetoond dat deze schade samenging met een zeer sterke stijging van de antioxidatieve capaciteit in de darmsapmonsters. Deze gegevens duiden op het feit dat oxidatieve schade in de dunne darm van mensen leidt tot een directe vrijmaking van antioxidanten. Onderzoek naar de identiteit van deze antioxidant heeft tot nu toe geen duidelijke identificatie opgeleverd. In dit onderzoek waren wij niet in staat om

de effecten van ijzertoediening in de dunne darm op de darmmucosa zelf te onderzoeken, omdat slechts darmvloeistof en geen darmweefsel werd afgenomen. Daarom hebben we in het onderzoek dat staat beschreven in **hoofdstuk 4** de darmperfusietechniek gecombineerd met het afnemen van darmweefsel door middel van gastroduodenoscopieën. In dat onderzoek zijn de effecten van verschillende doseringen ijzer op oxidatieve schade, op antioxidatieve capaciteit en op de genetische aansturing, ofwel de genexpressie, van cellen in de darmmucosa onderzocht. Dit onderzoek bevestigde dat ijzertoediening in de dunne darm oxidatieve schade en de vrijmaking van antioxidanten veroorzaakt. Beiden waren afhankelijk van de hoeveelheid ijzer dat werd toegediend. De toediening van ijzer veroorzaakte een verandering in de expressie van 89 genen. Na functionele analyse van deze genexpressie resultaten bleek dat zes biologische processen significant waren beïnvloed door de ijzertoedieningen. Enkele van deze processen waren betrokken bij de overdracht van signalen. Toekomstig onderzoek dat specifiek gericht dient te zijn op de bestudering van deze processen moet de biologische betekenis van deze resultaten ophelderen.

In **hoofdstuk 5** wordt de invloed van verschillende hoeveelheden ijzer op de opname van zink en koper beschreven. De resultaten van dit onderzoek laten zien dat de aanwezigheid van ijzer de opname van zink in de dunne darm remt. Hierbij maakt het niet uit of er een kleine of grote hoeveelheid ijzer aanwezig is. De opname van koper werd niet beïnvloed door de aanwezigheid van ijzer.

Het melkeiwit lactoferrine heeft, vooral door zijn sterk ijzerbindende capaciteit, verscheidene eigenschappen die de darmgezondheid kunnen verbeteren. Aan het molecuul worden onder andere antioxidatieve, antivirale, anti-inflammatoire en antibacteriële eigenschappen toebedeeld. Voordat kan worden onderzocht of er een rol voor lactoferrine in voedingssupplementen is weggelegd, dient eerst informatie verkregen te worden omtrent de afbraak van lactoferrine in het spijsverteringskanaal. In het onderzoek dat beschreven is in **hoofdstuk 6** is de afbraak van lactoferrine, afkomstig uit koemelk, in de maag onderzocht. Meer dan 60 % van het lactoferrine dat in de maag werd gebracht bleek onveranderd vanuit de maag in de dunne darm te worden geledigd. Voorgaand onderzoek liet zien dat lactoferrine dat verzadigd is met ijzer beter bestand zou zijn tegen afbraak in het spijsverteringskanaal dan onverzadigd lactoferrine. Dit werd echter niet bevestigd in ons onderzoek. In het volgende onderzoek, beschreven in **hoofdstuk 7**, hebben we de afbraak van recombinant humaan lactoferrine na passage van de maag en de dunne darm onderzocht met behulp van het ileostoma model. Het ingenomen lactoferrine werd volledig afgebroken tijdens de passage door de maag en dunne darm. De zeer kleine hoeveelheden lactoferrine die met een constante snelheid werden uitgescheiden uit de dunne darm waren zeer waarschijnlijk afkomstig uit endogene lactoferrine productie.

Naar aanleiding van de eerder gepubliceerde aanwijzingen dat lactoferrine de gezondheid op verschillende manieren kan bevorderen hebben we een onderzoek uitgevoerd naar het vermogen van lactoferrine om schade aan de darmmucosa te voorkomen. Voor dit onderzoek, dat beschreven staat in **hoofdstuk 8**, hebben we het medicijn indomethacine aan gezonde vrijwilligers gegeven. Indomethacine wordt in de medische praktijk voorgeschreven om pijn en ontstekingsreacties te bestrijden. Het heeft als bijwerking dat de darmmucosa wordt beschadigd, waardoor de darmdoor-